

文章编号: 1000-5013(2011)01-0062-05

生物酶降解米糠释放阿魏酸工艺条件优化

王谦, 李夏兰, 程珊影, 方柏山

(华侨大学 化工学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 采用均匀设计法和二次多项式逐步回归分析, 优化一株放线菌降解米糠释放反式阿魏酸的培养基配方, 并采用单因素法优化发酵条件. 优化后培养基配方: 米糠质量分数为 6%, 米糠粒径 0.50 mm, 酵母粉质量分数为 1.0%; 优化后的发酵条件: 发酵温度为 28 °C, 摇床转速 200 r · min⁻¹, 装液系数为 12%, 接种量的体积分数为 3.3%, pH 值 8.0. 实验结果表明, 反式阿魏酸的释放率最高为 14.55%, 与优化前相比, 释放率提高了 106.7%. 研究阿魏酸酯酶和木聚糖酶联合作用于米糠产阿魏酸和低聚糖的协同效应, 阿魏酸释放率达到 20.22%, 与阿魏酸酯酶单独降解米糠相比, 其释放率提高了 119.1%; 低聚木糖的释放量 2.04 mg · mL⁻¹, 与木聚糖酶单独降解米糠相比, 其释放量提高了 87.2%.

关键词: 阿魏酸; 米糠; 均匀设计; 木聚糖酶; 生物降解

中图分类号: Q 93-335

文献标识码: A

阿魏酸酯酶(EC 3.1.1.73)是羧酸酯水解酶的一个亚类, 属胞外酶. 很多微生物都可以分泌阿魏酸酯酶, 其主要生物功能是水解多糖与阿魏酸(Ferulic Acid, FA)连结的酯键^[1], 并将阿魏酸等酚酸游离出来. 目前发现的产阿魏酸酯酶的微生物, 主要有黑曲霉(*Aspergillus*)、侧孢霉(*Sporotrichum sp.*)、链霉菌(如 *Streptomyces avermitilis*)、杆菌(如 *Clostridium thermocellum*)等^[2]. 在植物细胞壁上, 由于阿魏酸的交联, 使得胞壁多糖之间紧密结合, 单一使用某种多糖水解酶, 并不能很好地渗入多糖分子内部, 导致水解率低. 如果采用阿魏酸酯酶和多糖水解酶共同作用于细胞壁, 同时打断阿魏酸酯键和糖苷键, 无疑将使低聚糖的水解产率得到提高, 同时又可生产阿魏酸. Yu 等^[3]采用酶法水解燕麦胶生产阿魏酸, 发现单独添加一定量的阿魏酸酯酶时, 只可释放 1.4% 的阿魏酸, 而同时添加木聚糖酶, 阿魏酸的释放量达到 69%. Bartolome 等^[4]用阿魏酸酯酶水解大麦麸生产阿魏酸时, 发现当添加木聚糖酶量低于 133.36 nkat · g⁻¹ 时, 木聚糖酶可以显著增加阿魏酸的水解率; 而当添加量达到一定值(高于 233.38 nkat · g⁻¹)后, 水解率随添加酶量上升的趋势减缓. 张璟等^[5]采用阿拉伯木聚糖酶和阿魏酸酯酶联合作用于麦麸多糖, 发现 6 h 后可以释放麦麸中 80% 以上的阿魏酸, 证明了双酶的协同效应. 关于产阿魏酸酯酶菌种的研究, 国内外大多都集中在真菌, 而放线菌的报道很少, 国内目前尚未见放线菌产阿魏酸酯酶的报道. 本文探讨了该菌种利用阿魏酸酯酶降解米糠释放阿魏酸工艺条件优化, 并初步研究阿魏酸酯酶和木聚糖酶联合作用于米糠产阿魏酸和低聚木糖的协同效应.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

(1) 菌种. 从土壤中筛选得到, 本实验室保藏.

(2) 培养基. (a) 斜面种子培养基. 高氏 1 号培养基. (b) 优化前的发酵培养基^[6]. KH₂PO₄ 1.0 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 4.0 g, NaCl 0.2 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, CaCl₂ 0.05 g, 米糠质量分数为 6%, 米糠粒径 0.250 mm, 酵母粉质量分数为 0.6%, 蒸馏水 1 L, 于 121 °C 下灭菌 20 min.

收稿日期: 2010-05-23

通信作者: 李夏兰(1965-), 女, 教授, 主要从事生物分离工程的研究. E-mail: xialan@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20276026, 20446004); 福建省科技计划重点项目(20031020)

(3) 材料. 新鲜脱脂米糠(福建泉州金穗米业公司), 甲醇(色谱纯, 江苏汉邦试剂有限公司), 冰醋酸(分析纯, 广东汕头市西陇化工厂), 反式阿魏酸(标准品, 美国 Sigma 试剂有限公司), 木聚糖酶(广东广州博士奥生化公司), 酵母粉(英国 Oxoid 试剂有限公司), 可溶性淀粉(分析纯, 天津市博迪化工有限公司), 其他试剂均为市售, 化学纯.

(4) 仪器. 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), ODS-C18 柱(美国 Thermo 公司), BS224S 型分析天平(德国 Sartorius 公司), 0.22 μm 的水性、油性过滤膜(德国 Membrana 公司), 无菌操作台(江苏苏州苏净集团安泰公司), 恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂), 恒温摇床(上海欣蕊自动化设备有限公司), 变频行星式珠磨机(江苏南京科析实验仪器研究所).

1.2 培养条件

(1) 斜面培养. 从已生长好的菌种斜面上挑取少量菌种, 移植至新鲜斜面培养基上, 培养 7 d.

(2) 优化前的发酵培养. 将培养 7 d 的斜面菌种用 10 mL 的无菌水清洗下来, 把 2 mL 的菌液接入 250 mL 的三角瓶中, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 摇床转速为 170 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 装液系数为 20%, 自然 pH 值.

1.3 阿魏酸酯酶酶液的制备

将发酵 3 d 的发酵醪液于 4 $^{\circ}\text{C}$, 8 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 20 min. 往离心后的上清液中加入硫酸铵至饱和度为 80%, 冰浴条件下缓慢加入硫酸铵, 搅拌至溶解后静置过夜. 然后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$, 8 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 20 min. 用一定量的缓冲液(pH 值为 6.0, 0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 + 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸)溶解沉淀, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 24 h, 得到自制阿魏酸酯酶酶液.

1.4 测定方法

1.4.1 反式阿魏酸 采用高效液相色谱(HPLC)法. 色谱条件: C18ODS 柱(4.6 mm \times 250 mm, 热电(上海)仪器有限公司), 流动相为甲醇、水、冰乙酸的体积比为 30 : 69.5 : 0.5, 流速为 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 318 nm, 进样量为 20 μL , 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$. 样品于离心机(8 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)上离心 20 min, 取上清液 0.5 mL, 加入 1.0 mL 体积分数为 50% 的甲醇, 于 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min. 上清液经 0.22 μm 微孔过滤膜过滤两次后, 上样分析反式阿魏酸的量, 并计算反式阿魏酸的释放率(η). 即

$$\text{反式阿魏酸的释放率} = \frac{\text{米糠发酵释放的阿魏酸量}}{\text{碱提等量米糠可得到的阿魏酸量}} \times 100\%.$$

1.4.2 米糠中碱提反式阿魏酸 米糠经珠磨机粉碎, 过 100 目筛, 取 0.10 g 于水解管中, 加入 5.5 mL, 4 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液, 充入 N_2 后, 置于恒温振荡器中, 在避光及室温下振荡水解 24 h. 水解液于 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 15 min, 上清液用 2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 调节 pH 值至 2.0, 以体积比为 1 : 1 的醋酸乙酯萃取其中的阿魏酸. 试验结果表明, 所产生的阿魏酸的量为 0.16 mg, 米糠碱解反式阿魏酸总量得率为 0.16%, 与文[7]的报道相当.

1.4.3 低聚木糖 采用 HPLC 法. 色谱条件: Aminex HPX-87H 色谱柱, RID 示差折光检测器, 柱温为 50 $^{\circ}\text{C}$, 流动相为 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸(超声波脱气 15 min), 流速为 0.4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量为 20 μL , 所有样品经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后上样分析样品中的低聚木糖质量分数. 将相应低聚木糖的峰面积之和按照木二糖的标准曲线来计算低聚木糖的量, 从而得出低聚木糖的总量.

2 结果与讨论

2.1 发酵培养基的优化

在菌种发酵产反式阿魏酸的过程中, 碳源和氮源的量尤其重要. 因此, 以调整相关系数 R 最大为原则, 进行变量的引入或剔除, 从而得出均匀设计 U_7^3 表^[8], 均匀设计实验方案及实验结果, 如表 1 所示. 表 1 中, 米糠质量分数为 X_1 , 米糠粒径为 X_2 , 酵母粉质量分数为 X_3 , FA 释放率为 Y .

用数学软件 DPS 进行二次多项式逐步回归分析^[5], 得出的回归方程为

$$Y = 0.0895 + 0.502X_1 + 0.0775X_2 - 27.5X_3 - 1.905X_2X_2 + 141.8X_2X_3.$$

其中, 相关系数 R 为 0.999 92, F 值为 1 236.803 5, 显著水平 p 为 0.021 6, 剩余标准差 S 为 0.000 68, 调整后的相关系数 $R_a = 0.999 52$, 说明该方程能很好地拟合放线菌发酵制阿魏酸的过程. 通过对该模型进行显著性检验, 结果如表 2 所示.

从表 2 可知,对阿魏酸释放率的影响的大小顺序: $X_1 X_3 = X_2 X_3 > X_2 X_2 > X_1 X_2$. 从以上结果可以知道,因素之间存在交互作用. 从回归方程得出最佳的培养基配方:米糠质量分数为 6%,米糠粒径为 0.50 mm,酵母粉质量分数为 1.0%.

在此优化培养基条件下,可以得到反式阿魏酸的释放率为 11.50%,而其预测值为 12.21%,而实验值与预测值的绝对误差为 0.71%;而培养基优化前,反式阿魏酸的释放率为 6.37%. 结果表明,经均匀设计优化后的反式阿魏酸,其释放率提高了 80.5%.

2.2 发酵条件对阿魏酸释放率的影响

2.2.1 发酵温度 在摇床转速为 $170\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, pH 值为 8.0 条件下,考察发酵温度(θ)对阿魏酸释放率(η)的影响,结果如图 1(a)所示. 由图 1(a)可知,在温度为 28℃时,菌株降解米糠的 FA 释放率为 11.2%;而在 28℃之后,随着温度的升高,FA 释放率逐渐降低. 因此,菌株的发酵温度以 28℃为宜.

2.2.2 摇床转速 其他条件不变情况下,考察摇床转速(v)对阿魏酸释放率(η)的影响,结果如图 1(b)所示. 由图 1(b)可知,FA 的释放率随着摇床转速的不断升高而提高,当摇床转速为 $220\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,粗酶液酶解米糠的 FA 释放率达到 11.1%. 这是因为随着摇床转速的升高,供氧量也相应提高,而放线菌为好氧菌,所以菌株降解米糠产阿魏酸的释放率相应提高. 因此,摇床转速选为 $220\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$.

2.2.3 装液系数 其他条件不变情况下,考察装液系数(β)对阿魏酸释放率(η)的影响,结果如图 1(c)所示. 由图 1(c)可知,当装液系数为 12%时,菌株降解米糠的 FA 释放率达到 9.7%;然后,FA 释放率随着装液量的增加而降低. 因此,装液系数选为 12%.

2.2.4 接种量 其他条件不变情况下,考察接种量(体积分数, φ)对阿魏酸释放率(η)的影响,结果如图 1(d)所示. 由图 1(d)可知,采用装液系数为 12%,接种量为 3.3%时,粗酶液酶解米糠的 FA 释放量达到 10.5%;其后,FA 释放率随着接种量的增加而降低. 这是因为接种量过高,会导致菌株因碳源的不足而利用阿魏酸来作为碳源,继续进行新陈代谢,从而使 FA 释放率降低. 因此,接种量选为 3.3%.

2.2.5 pH 值 其他条件不变情况下,考察 pH 值对阿魏酸释放率(η)的影响,结果如图 1(e)所示. 由图 1(e)可知,发酵培养基的 pH 值为 8.0 时,粗酶液酶解米糠的 FA 释放率达到 8.8%;其后,FA 释放率随着 pH 值的增加而降低. 放线菌的最适生长 pH 值一般呈微碱性,因此, pH 值选为 8.0.

由以上实验得出菌种发酵产阿魏酸的优化条件:发酵温度为 28℃,摇瓶转速为 $220\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,装液系数为 12%,接种量为 3.3%,初始 pH 值为 8.0. 在采用优化后的培养基发酵培养的条件下,优化工艺前、后反式阿魏酸的释放率分别为 14.55%,7.04%,优化后的反式阿魏酸的释放率提高了 106.7%.

表 1 培养基优化均匀设计结果

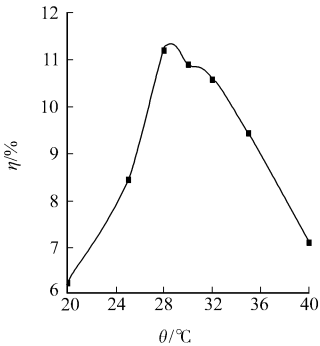
Tab. 1 Result of uniform-design

实验号	$X_1/\%$	X_2/mm	$X_3/\%$	$Y/\%$
1	8	0.355	0.6	5.4
2	10	0.250	0.1	4.8
3	12	0.150	1.0	5.6
4	6	0.500	0.8	2.9
5	4	0.076	0.4	3.7
6	1	0.039	0.2	5.1
7	2	0.054	0	9.8

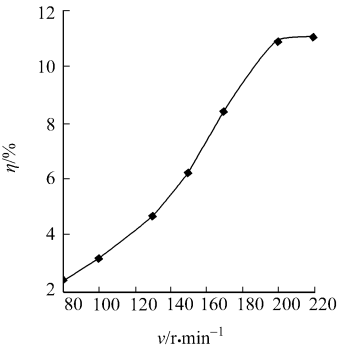
表 2 用逐步回归法处理数据的结果

Tab. 2 Results of quadratic polynomial regression

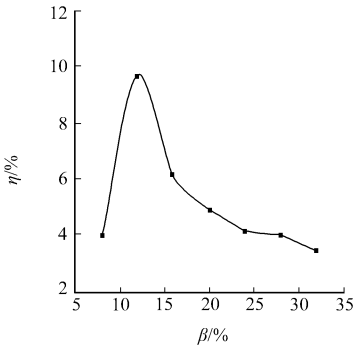
因素	偏相关	t 值	p 值
$X_2 X_2$	-0.999 73	42.844 93	0.000 54
$X_1 X_3$	-0.999 88	65.888 53	0.000 23
$X_2 X_3$	0.999 88	63.929 11	0.000 24
$X_1 X_2$	0.998 98	22.122 70	0.002 04



(a) 发酵温度



(b) 摇床转速



(c) 装液系数

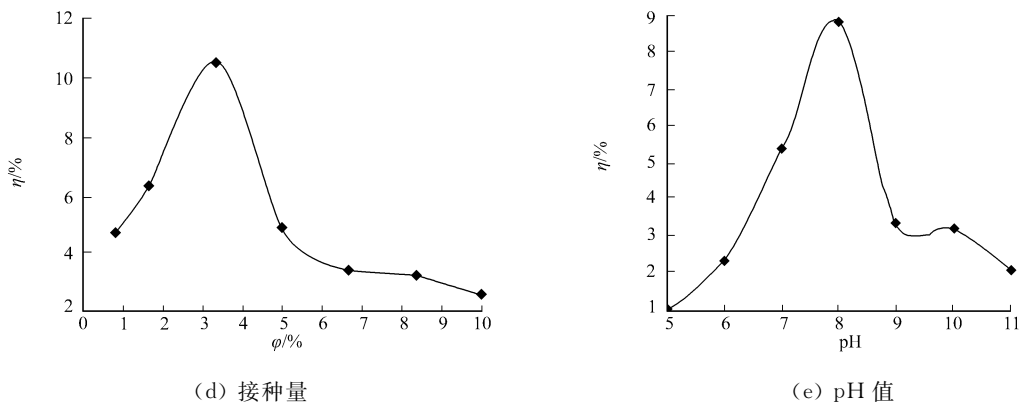


图 1 发酵条件对阿魏酸释放率的影响
Fig.1 Release rate of FA in concert with optimal conditions

2.3 双酶降解米糠的协同效应

通过 3 组实验,对自制阿魏酸酯酶酶液与木聚糖酶降解米糠的协同效应进行考察,如图 2 所示. 3 组实验的步骤:(1) 取 10 mL 自制阿魏酸酯酶酶液,加入 1.0 g 米糠,在 40 ℃下反应 12 h 后,再加入 10 mL, pH=6.0 的缓冲液,继续反应 12 h;(2) 取 10mL, 0.25 g · L⁻¹木聚糖酶液,加入 1.0 g 米糠,在 40 ℃下反应 12 h,再加入 10 mL, pH=6.0 的缓冲液,继续反应 12 h;(3) 取 10mL, 0.25 g · L⁻¹木聚糖酶液,加入 1.0 g 米糠,在 40 ℃下反应 12 h,再加入 10 mL 自制阿魏酸酯酶酶液,继续反应 12 h.

由图 2 可知,第 3 组实验的降解效果最好. 其中,反式阿魏酸释放率为 20.22%,比第 2 组实验提高了 987.1%,比第 1 组实验提高了 119.1%;低聚木糖释放量(ρ)为 2.04 g · L⁻¹,比第 2 组实验提高了 87.2%,比第 1 组实验提高了 482.9%. 实验结果表明,阿魏酸酯酶在木聚糖酶的协同作用下,可以更好地降解米糠释放反式阿魏酸和低聚木糖.

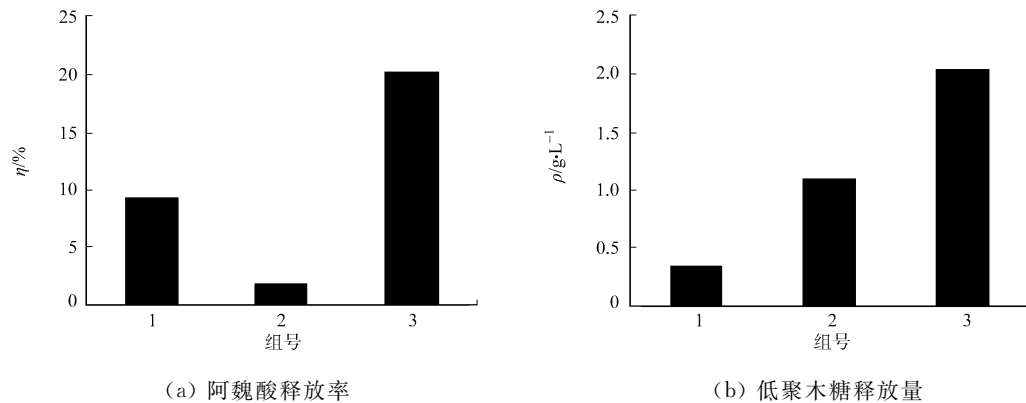


图 2 双酶降解米糠的协同效应
Fig.2 Synergistic effect of mixed enzymes which were used to degrade ricebran

Ferreira 等^[9]研究并证实了放线菌产生的阿魏酸酯酶和木聚糖酶之间的协同作用. 如与木聚糖酶协同作用,嗜热侧孢霉产生的阿魏酸酯酶(StFaeC),从植物纤维质中释放的阿魏酸是无木聚糖酶时的 10 倍^[10]. 阿拉伯呋喃糖苷酶和木聚糖酶等多糖水解酶,可以增强 α-葡萄糖苷酸酶、乙酰木聚糖酯酶和阿魏酸酯酶等侧链水解酶的催化作用. 一方面,木聚糖酶催化多糖主链断裂成小分子的片断,有利于酯酶催化;另一方面,酯酶水解酚环,从而使得木聚糖酶更易接近木聚糖主链骨架.

3 结束语

实验用的放线菌产酶降解米糠释放反式阿魏酸的能力有待进一步的提高. 一方面,需要进一步研究其他细胞壁降解酶(主要是阿拉伯木聚糖酶)协助阿魏酸酯酶降解米糠释放反式阿魏酸的协同方式;另一方面,可通过分子生物学的方法,将阿魏酸酯酶的基因进行克隆表达,提高菌种产阿魏酸酯酶的活力,从而提高反式阿魏酸的释放量.

参考文献:

- [1] YU P Q, MCKINNON J J, CHRISTENSEN D A. Hydroxycinnamic acids and ferulic acid esterase in relation to biodegradation of complex plant cell walls[J]. Canadian Journal of Animal Science, 2005, 85(3): 255-267.
- [2] SISDHU MATHEW, T EMILIA ABRAHAM. Ferulic acid: An antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2004, 24(2/3): 59-83.
- [3] YU P Q, MAENZ D D, MCKINNON J J, et al. Release of ferulic acid from oat hulls by *Aspergillus ferulic* acid esterase and *Trichoderma xylanase*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(6): 1625-1630.
- [4] BARTOLOME B, FAULDS C B, WILLIAMSON G. Enzymic release of ferulic acid from barley spent grain[J]. J Cereal Sci, 1997, 25(3): 285-288.
- [5] 张璟, 欧仕益. 酶解麦麸制备阿魏酸和低聚糖的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(11): 63-68.
- [6] 黄艳凤, 周庆礼, 李士炼. 从黑麦麦麸中提取的阿魏酸的检测[J]. 药物生物技术, 2004, 11(1): 49-51.
- [7] 张国升. 从米糠中提取阿魏酸的研究[J]. 安徽中医学院学报, 1997, 16(6): 56-57.
- [8] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] BERZILLON C, KROON P A, FAULDS C B, et al. Novel ferulic acid esterases are induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar beet pulp[J]. Appl Biotechnol, 1996, 45(3): 371-376.
- [10] TOPAKAS E, VAFIADI C, STAMATIS H. Sporotrichum thermophile type C feruloyl esterase (StFaeC): Purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(5/6): 729-736.

Process Optimization of Ferulic Acid Released from Rice Bran by Biological Enzymolysis

WANG Qian, LI Xia-lan,
CHENG Shan-ying, FANG Bai-shan

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: The optimal media formulations of ferulic acid released from rice bran by actinomycosis were obtained by uniform-design and quadratic polynomial regression techniques. The best prescription was: rice bran 6%(mass fraction), rice bran granularity 0.50 mm, yeast powder 1.0%(mass fraction). On this basis, the optimal ferment condition was confirmed by single factor method. The optimal conditions were as follows: fermentation temperature 28 ℃, rotation speed 200 r · min⁻¹, liquid volume in flask 12%, inoculation quantity 3.3%, pH 8.0. The release rate of ferulic acid reached 14.55% which was increased by 106.7% compared with that of unoptimized conditions. The synergistic effect of mixed enzymes containing ferulic acid esterase (FAE) and xylanase which were used to hydrolyze destarched rice bran. The release rate of FA reached 20.22%, which was increased by 119.1% compared with enzymatic hydrolysis of rice bran by ferulic acid esterase only. The release amount of xylooligosaccharides reached 2.04 mg · mL⁻¹, which was increased 87.2% compared with enzymatic hydrolysis of rice bran by xylanase only.

Keywords: ferulic acid; rice bran; uniform design; xylanase; biodegradation

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)